Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 4, Oct- Nov 2017, p. 553-565

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 13، شماره 4، مهر - آبان 1396، ص. 565-553

ارزیابی خصوصیات ریزکپسول‌های چند لایه حاوی دی استیل بر پایه جذب الکترواستاتیک فیبریل‌های ایزوله پروتئین سویا و پکتین

الهام انصاری‌فر[1]- فخری شهیدی[2*]- محبت محبی[2]- آرش کوچکی[3]- نوید رمضانیان[4]

تاریخ دریافت: 1395/02/12
تاریخ پذیرش: 1395/05/16

چکیده

در این پژوهش ریزکپسول‌های جدید با جذب لایه به لایه پلی‌الکترولیت‌هایی از فیبریل‌های ایزوله پروتئین سویا و پکتین با درجه متوکسیل بالا آماده شد. ویژگی‌های ظاهری فیبریل‌ها با AFM وTEM، خصوصیات ریزکپسول‌ها، اندازه و یکنواختی، زتا پتانسیل، مورفولوژی و کینتیک رهایش دی استیل بررسی شد. نتایج نشان دادند که فیبریل‌های ایزوله پروتئین سویا، ضخامتی بین 1 تا 10 نانومتر دارند و ساختارشان بسیار منشعب است. تصاویر SEM نشان دادند که ریزکپسول‌ها کروی بوده و با افزایش تعداد لایه‌های دیواره، ضخامت آن افزایش یافته که منجر به بهبود استحکام کپسول شده است. با افزایش تعداد لایه‌ها شیب پروفایل رهایش دی استیل کاهش یافت و حداکثر زمان رهایش دی استیل به‌عنوان تابعی از تعداد لایه‌ها به‌طور یکنواخت افزایش یافت که می‌توان این گونه استنباط کرد که با افزودن تعداد لایه‌های دیواره ریزکپسول، رهایش ماده ریزپوشانی شده را می‌توان به تاخیر انداخت. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که مدل کینتیکی ریگر-پپاس از نظر ریاضی بهترین توصیف را برای رهایش دی استیل از ریزکپسول‌ها فراهم آورد، به‌گونه‌ای که ضریب همبستگی حاصل در تمامی برازش‌ها با این مدل بالای 0/94 بود. این روش تولید ریزکپسول‌ها، بسیار آسان و به‌راحتی قابلیت تولید در مقیاس صنعتی دارد.

واژه‌های کلیدی: ریزکپسول‌های چندلایه، کنترل رهایش، فیبریل ایزوله پروتئین سویا، پکتین، دی استیل

مقدمه

امروزه بررسی پایداری عطر و طعم در مواد غذایی مختلف به سبب ارتباط مستقیم آن با کیفیت و قابلیت پذیرش غذا توسط مصرف‌کننده رو به افزایش می‌باشد (Bucking *et al*., 2003). برای کاهش تخریب یا از دست دادن مواد عطری و طعمی طی نگهداری و فرآوری و نیز کنترل آزادسازی آنها طی مصرف، ریزپوشانی این مواد قبل از افزودن آنها به مواد غذایی یکی از روش های مطلوب می باشد (Madene *et al*., 2006). ریزپوشانی مواد معطر این امکان را فراهم می‌آورد تا ضمن حفظ و نگهداری ماده معطر، امکان آزادسازی آن در زمان، مکان یا محصول خاص فراهم شود. طراحی منطقی سیستم ریزپوشانی نیازمند داشتن اطلاعات جامع فیزیکوشیمیایی و فهم مکانیسمی که طی آن ماده معطر ریزپوشانی شده و آزاد شود، می‌باشد (Gunning *et al*.,1999).

ریزپوشانی فرآیند به دام انداختن ترکیبات فعال درون ماده حامل[5] است که به‌عنوان وسیله‌ای مفید برای بهبود تحویل این ترکیبات فعال مطرح می‌باشد (Nedovic *et al*., 2011). از محدودیت‌های قابل توجهی که مواد تشکیل‌دهنده کپسول در صنعت غذا دارند، می‌توان به قابلیت خوراکی، ارزان قیمت بودن، در دسترس بودن برای واحدهای تولیدکننده اشاره کرد. همچنین فرایند ریزپوشانی باید روندی آسان، راحت، ارزان و قابلیت برای تولید مقادیر زیاد صنعت را داشته باشد (Sagis *et al*., 2008). اگرچه روش‌های متعددی برای ریزپوشانی وجود دارد، اما بسیاری از آنها به سبب دشواری، عدم مقاومت مکانیکی کپسول حاصل و هزینه بالای تولید، کاربرد صنعتی چندانی ندارد. در این میان روشی که دچر و همکاران در سال 1991 بکار بردند جذب سطحی لایه به لایه الکترواستاتیک[6] نام دارد که در صنعت می‌تواند به‌کار رود (Decher *et al*., 1992). LBL یک تکنیک محبوب برای تولید کپسول‌های پلی‌الکترولیت است. این امر

1، 2 و 3- به‌ترتیب دانشجوی دکترا، استاد و دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
4- استادیار، گروه شیمی پلیمر، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد.
(* - نویسنده مسئول: Email: fshahidi@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v1395i0.55558

5 Carrier material
6 Electrostatic layer-by-layer (LbL) adsorption

می‌تواند به دلیل توانایی این روش در ایجاد پوسته‌های کپسول مناسب از طریق یک فرایند جذب ساده، ارزان و قابل کنترل (Peyratout and Dahne, 2004) همراه با قابلیت تولید کپسول‌هایی در اندازه‌های مختلف، در محدوده نانومتر تا مقیاس میکرومتر باشد (Sagis *et al*., 2008; Yow and Routh, 2006). استحکام مکانیکی و نفوذپذیری کپسول‌ها می‌تواند با تغییر تعداد لایه‌های دیواره یا تغییر خصوصیات مواد ریزپوشانی شده کنترل شود (Sagis *et al*., 2008). در این تکنولوژی، دیواره‌های پلی الکترولیت با تجمع موادی با بار مخالف (پلی‌آنیون‌ها و پلی‌کاتیون‌ها) که به‌وسیله پیوندهای الکترواستاتیک ایجاد می‌شود، تشکیل می‌گردد (Ai, Jones and Lvov, 2003; Decher, 2003; McClements, 2005). ریزکپسول‌های چند لایه که با این روش آماده می‌شوند، پتانسیل کاربردی بسیاری مانند کنترل رهایش مواد حامل را دارند (Mansur, Dejugnat and Sukhorukov, 2006; Wang and *et al*, 2008).

پروتئین‌های غذایی خصوصیت امولسیون‌کنندگی و تشکیل فیلم بسیار عالی داشته، بارهایشان بوسیله‌ی تغییر pH محلول قابل تنظیم می‌باشد که شرایط را برای ریزپوشانی بر پایه تجمع الکترواستاتیک لایه به لایه ایجاد می‌کنند. پروتئین سویا از مهم‌ترین منابع پروتئینی تجاری است که استفاده از آن به دلیل ویژگی‌های عملکردی مطلوب در سیستم‌های غذایی، سهل‌الوصول بودن، هزینه پایین و ارزش تغذیه‌ای بالا گسترش یافته است. ایزوله پروتئین سویا[1] خالص‌ترین فرم پروتئینی از محصولات سویا با ارزش بیولوژیکی و خصوصیات عملکردی بالایی می‌باشد. به‌واسطه ترکیبات شیمیایی، خواص آمفی‌فیلیک، وزن مولکولی بالا و انعطاف‌پذیری زنجیره‌های مولکولی از پروتئین سویا برای پایداری امولسیون استفاده می‌کنند (Nishinari *et al*., 2014; Nesterenko *et al*., 2012).

پکتین یک پلی‌ساکارید محلول است که به‌طور گسترده در تولید مواد غذایی استفاده شده و ادعا می‌شود که فواید سلامتی بخش زیادی دارد (Sriamornsak, 2003). پکتین با درجه متوکسیل بالا[2] در محلول‌های اسیدی ملایم به دلیل حضور گروه‌های کربوکسیلیک یونیزه در طول ستون اصلی‌اش دارای بار منفی است (Morris *et al*., 1980).

هدف از انجام این تحقیق تولید و ارزیابی ویژگی‌های ریزکپسول‌های جدید و چند لایه از فیبریل‌های ایزوله پروتئین سویا و پکتین و بررسی رهایش دی استیل ریزپوشانی شده در این ریزکپسول‌ها می‌باشد. نتایج این تحقیق می‌تواند برای پیش‌بینی رهایش عطر و طعم از ریزکپسول‌ها مختلف و نیز تاثیر شرایط محیطی بر آنها مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

ایزوله پروتئین سویا (SPI) (شرکت به پارس، حاوی94 درصد پروتئین)، پکتین با درجه متوکسیل بالا (HMP) (Hi-Methoxyl, kosher certified. CAS: 9000-69-5, Sciencelab, InC) (69/8 درصد درجه متوکسیله شده)، ۲،۳ بوتاندیون[3] (دی استیل)- شرکت سیگما (Sigma Number: B85307)، روغن آفتابگردان با نام تجاری فامیلا از بازار محلی تهیه شد. ارتو فنیل دی آمین[4]- شرکت سیگما (Sigma Number:23938)، بیکربنات سدیم ($NaHCO_3$)- شرکت سیگما (Sigma Number: 71630)، کلرید سدیم (NaCl)- شرکت سیگما (Sigma Number: S7653)، اسید هیدروکلریدریک 37درصد- شرکت سیگما (Sigma Number: 84415)، فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم (KH_2PO_4)- شرکت مرک (Code:105108)، فسفات هیدروژن دی‌پتاسیم (K_2HPO_4)- شرکت مرک (Code:105109)، آنزیم آلفا آمیلاز- شرکت مرک (Code:141783) تهیه شدند.

آماده‌سازی فیبریل‌های ایزوله پروتئین سویا[5]

فیبریل‌های ایزوله پروتئین سویا، به روش Akkermans و همکاران (2008) با مقداری تغییرات تولید شدند. مطابق این روش، محلول 6 درصد وزنی/ حجمی ایزوله پروتئین سویا (SPI) آماده شده و با اسیدکلریدریک یک مولار به pH=2 رسید. برای جذب حداکثر آب توسط پروتئین، دیسپرسیون به مدت 24 ساعت در دمای 4 درجه سانتی‌گراد محلول همزده شد. سپس سانتریفوژ g× 22600 در دمای 4 درجه سانتی‌گراد، به مدت 30 دقیقه انجام شد تا مواد غیرمحلول جدا شوند. سپس محلول در دمای 85 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت حرارت داده شد سپس به سرعت با حمام یخ سرد شد و با خشک‌کن انجمادی (Christ Alpha LD، آلمان) تبدیل به پودر شد.

ارزیابی فیبریل‌ها با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)

مورفولوژی فیبریل‌های SPI با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM, LEO 912 ab, Zeiss Germany) و میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM, Ara research, model: Full plus, Iran) بررسی شدند.

آماده‌سازی سوسپانسیون

محلول 1 درصد HMP و 0/5 درصد FSPI (فیبریل‌ها تهیه شده

1 Soy protein isolated (SPI)
2 High methoxyl pectin (HMP)

3 2,3-Butanedione
4 O-phenylenediamine (OPDA)
5 Fibril soy protein isolated

مطابق روش بالا) تهیه کرده شد. pH سوسپانسیون‌ها با افزودن محلول 0/1 نرمال اسید کلریدریک (HCL) و هیدروکسید سدیم (NaOH) در نقطه 3/5 تنظیم شد و به مدت 24 ساعت همزده شدند تا کاملا هیدراته شوند. برای تهیه تمام دیسپرسیون‌های فوق از آب دیونیزه استفاده شد.

تهیه امولسیون

تهیه امولسیون به روش Humblet-Hua و همکاران (2011) با اندکی تغییرات انجام شد: به‌طور خلاصه، در ابتدا 0/05 گرم از دی استیل (2و3-بوتانیدیون) با 1/95 گرم روغن در دمای اتاق، توسط همزن (Digital electrical stirrer-Teb azma، ایران) با سرعت 100 دور در دقیقه به مدت 1 دقیقه مخلوط شد. سپس، امولسیون روغن در آب، حاوی 2 درصد (وزنی/ حجمی) از مخلوط بالا در محلول 0/5 درصد (وزنی/حجمی) فیبریل‌های پروتئین ایزوله سویا در طی دو مرحله تهیه شد. در مرحله اول، تمامی اجزاء توسط همگن‌ساز اولتراتوراکس (T50- IKA، آلمان) با سرعت 13500 دور در دقیقه به مدت 90 ثانیه مخلوط شدند. در مرحله بعدی، برای همگن‌سازی ثانویه از یک دستگاه مولد امواج فراصوت (مدل VCX750، شرکت Sonics& Material، آمریکا) با توان اسمی 750 وات فرکانس 20 کیلوهرتز بکار برده شد. مدت زمان اعمال امواج فراصوت 5 دقیقه به‌صورت مداوم و در حداکثر توان اسمی دستگاه برنامه‌ریزی گردید. دمای نمونه‌ها در طول فرآیند، با چرخش مداوم آب سرد در اطراف ظرف حاوی نمونه در محدوده 20 درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شد. جداسازی سرم از ذرات امولسیون توسط سانتریفوژ کردن امولسیون در دو مرحله: مرحله اول g× 50 به مدت 45 دقیقه و مرحله دوم g× 750 به مدت 1 دقیقه در دمای 20 درجه سانتی‌گراد انجام شد، و در نهایت ذرات امولسیون از سرم جدا شدند. 2 درصد(وزنی/ حجمی) از ذرات امولسیون حاصل به محلول بعدی، پکتین با درجه متوکسیل بالا (لایه زوج) یا محلول فیبریل‌های پروتئین سویا باشد (لایه فرد) اضافه شد. برای افزودن هر لایه به دیواره ذرات امولسیون، روش فوق تکرار شد (شکل 1).

تهیه ریزکپسول‌ها

جهت تهیه ریزکپسول‌ها از خشک‌کن افشانه‌ای (Mini Spray Dryer، Buchi، سوئیس) استفاده شد. شرایط خشک کرن عبارت بودند از: دمای هوای ورودی 10± 180 درجه سانتی‌گراد، دمای هوای خروجی 10± 90 درجه سانتی‌گراد و سرعت پمپ خوراک‌دهی 25 میلی‌لیتر در دقیقه بود. جهت جلوگیری از جذب رطوبت، پودرهای تهیه شده بلافاصله به قوطی پلاستیکی دربدار منتقل و تا انجام آزمایش‌های بعدی در داخل دسیکاتور نگهداری شدند.

اندازه ذرات

متوسط قطر و توزیع اندازه قطرات امولسیون به کمک دستگاه انکسار نور لیزر (Fritsch Analysette 22, German) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. به این ترتیب که نمونه امولسیون تا رسیدن به محدوده انسداد نوری قابل قبول توسط دستگاه، قطره قطره به درون مخزن آب آن اضافه شد و به‌طور مداوم مخلوط گردید تا از یکنواختی آن اطمینان حاصل شود. پس از آن نمونه به محفظه عبور نور لیزر منتقل و توزیع اندازه ذرات از روی میزان پراکنش نور و بر مبنای مدل لورنزمی و تئوری فرانهوفر تعیین گردید.

تعیین بار الکتریکی ذرات

اندازه‌گیری بار الکتریکی ذرات موجود در امولسیون با استفاده از دستگاه زتاسایزر (Nano-ZS, Malvern, England) و بر مبنای سنجش جابجایی الکتروفورتیک ذرات انجام شد. تمامی نمونه‌ها بلافاصله پس از تهیه با 4 تکرار اندازه‌گیری شدند و سپس میانگین آن‌ها گزارش گردید.

عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

برای مشاهده ریزساختمان ریزکپسول‌های تهیه شده، از میکروسکوپ الکترونی روبشی (360- S، Axford، انگلیس) استفاده شد. مقدار کمی از نمونه به کمک چسب نقره بر روی یک استاب آلومینیومی گذاشته شد و سپس توسط یک لایه نازک از جنس طلا در دستگاه پوشش‌دهنده به مدت 6 دقیقه جهت رسانا شدن قرار گرفتند. نمونه‌ها به اتاقک تحت خلأ منتقل گردیدند. شعاعی از الکترون‌های پر شتاب با ولتاژ 20 کیلوولت به نمونه‌ها تابیده شد و تصویر بر اساس شعاع الکترونی برگشتی از نمونه‌ها به‌دست آمد (Arsianti *et al*., 2011).

راندمان ریزپوشانی

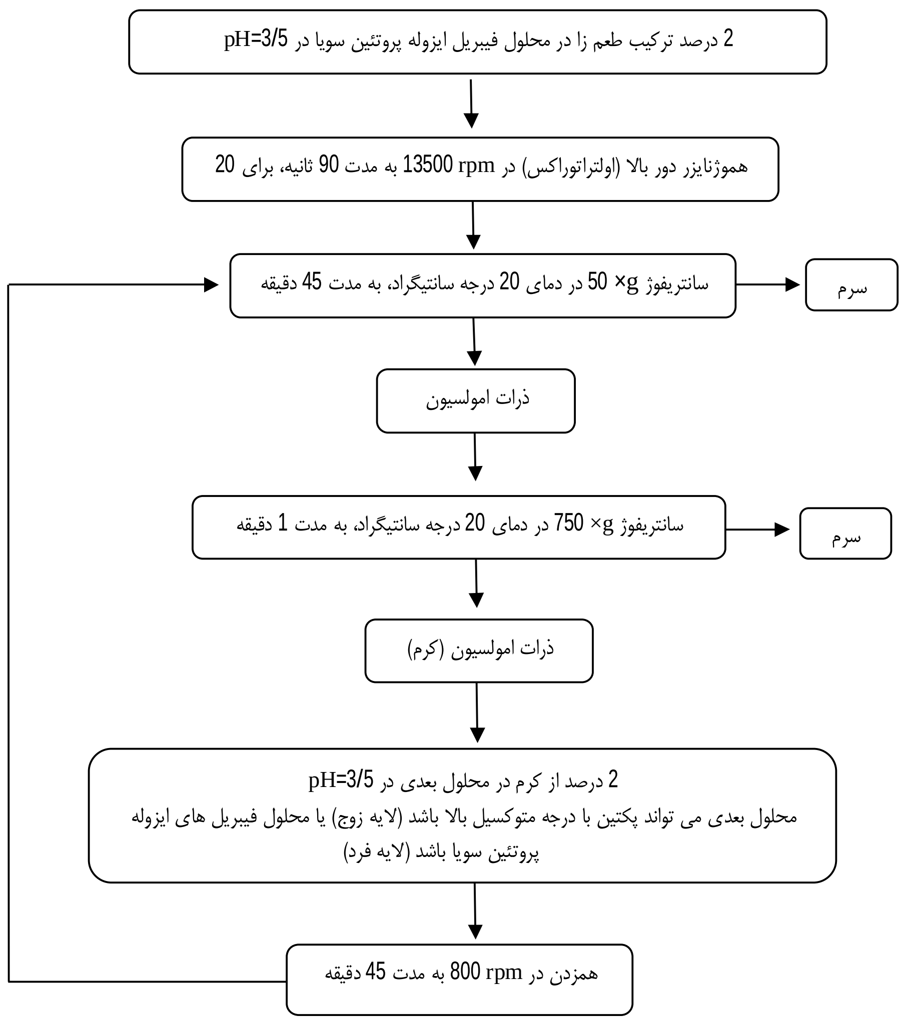
جهت محاسبه راندمان ریزپوشانی خارج قسمت مقدار دی استیل در پودر به مقدار آن در امولسیون اولیه مطابق رابطه زیر محاسبه شد:

(1) 100× (گرم دی استیل در امولسیون اولیه/ گرم دی استیل در پودر) = راندمان ریزپوشانی

بررسی کینتیک رهایش و برازش داده‌ها

برای بررسی نحوه رهایش دی استیل ریزپوشانی شده از ریزکپسول های چند لایه تولیدی، رهایش این ریزکپسول‌ها در شرایط شبیه‌سازی شده دهانی در حضور بزاق مصنوعی در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و در سه نیروی برشی صفر، 50 و 100 معکوس ثانیه صورت گرفت. بزاق مورد استفاده در این مدل با استفاده از روش روث

و کالمس تهیه شد (Roth and Calmes, 1981). برای اعمال دما و تنش برشی از دستگاه شبیه‌ساز دهان که توسط محبّی و همکاران (1393) طراحی و ساخته شد، استفاده گردید. تنظیم pH با استفاده از محلول‌های 0/1 نرمال اسید کلریدریک و هیدروکسید سدیم انجام شد. نسبت بزاق مصرفی به ریزکپسول نیز براساس پژوهش Zandi و همکاران (2013) تعیین گردید، بدین صورت که ریزکپسول‌های پراکنده شده در بزاق به نسبت 4 به 1 مخلوط و رهایش بررسی شد. برای رسم پروفایل رهایش دی استیل، در فواصل زمانی یک دقیقه با استفاده از سرنگ مقدار 1 میلی‌لیتر از نمونه برداشته شده و از کاغذ واتمن شماره 1، عبور داده شد تا ریزکپسول‌ها از محیط جدا گردند. این مقدار نمونه با 0/50 میلی‌لیتر از شناساگر ارتوفنیلن دی آمین (1 درصد در اسید هیدروکلریدریک 4 مولار) ترکیب و 20 دقیقه در محیط تاریک قرار داده شد، پس از این زمان 0/2 میلی‌لیتر اسید کلریدریک 4 مولار به محلول اضافه و به کوت سیلیکایی دستگاه اسپکتروفتومتری (WPA lightwave s2000 uv/vis) منتقل و میزان جذب آن در طول موج 335 نانومتر اندازه‌گیری شد (Rodrigues and Barros, 1997).



شکل 1- فلوچارت فرایند ریزپوشانی طعم به روش Humblet-Hua و همکاران (2011) با اندکی تغییرات.

مدل‌سازی

برای بررسی رهایش دی‌استیل از ریزکپسول‌های چند لایه و همچنین آنالیز کینتیک رهایش آن، از مدل‌های مختلفی شامل معادله درجه صفر، درجه اول[1]، هیگوچی[2] و ریگتر- پپاس[3] استفاده شد

1 First order model
2 Higuchi

(Dash *et al*., 2010).

$$C = Kt \quad (2)$$

$$C = [1 - \exp(-Kt)] \times 100 \quad (3)$$

$$C = Kt^{0.5} \quad (4)$$

$$C = Kt^{n} \quad (5)$$

در این روابط C غلظت ماده طعمی آزاد شده در زمان t، K ثابت کینتیکی و n توصیف کننده فرآیند رهایش است. پارامتر آخر به‌منظور مشخص نمودن مکانیسم‌های مختلف رهایش استفاده می‌شود. در صورتی که میزان پارامتر n کمتر از 0/45 باشد رهایش بر اساس مکانیسم نفوذ فیک کنترل می‌شود. اگر بزرگتر از 0/89 باشد بر اساس مکانیسم انحلال و اگر بین این دو مقدار باشد هر دو مکانیسم غالب می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای انجام آنالیز آماری داده‌ها و بررسی اطلاعات بدست آمده از آزمایش‌های مختلف، از طرح فاکتوریل استفاده شد. کلیه آزمون‌ها حداقل در دو تکرار انجام شده، سپس میانگین و انحراف معیار آنها بدست آمد. آنالیز واریانس[4] برای بررسی معنی‌داری اختلافات در سطح $p < 0/05$ بکار گرفته شد و به‌منظور تعیین اختلاف بین میانگین اعداد، پس از آنالیز واریانس از آزمون دانکن استفاده گردید. تمام مراحل تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه 21) صورت پذیرفت. برازش داده‌ها با استفاده از معادلات ارائه شده به کمک نرم‌افزار متلب (نسخه R2014) صورت گرفت و بهترین مدل براساس اندازه‌گیری ضریب همبستگی[5] انتخاب و پیشنهاد گردید.

نتایج و بحث

میکروسکوپ الکترونی روبشی و میکروسکوپ نیروی اتمی

فیبریل‌های پروتئینی تجمعات خطی شکلی هستند که با حرارت دادن محلول پروتئینی برای یک مدت طولانی در pH و قدرت یونی پایین تشکیل می‌شوند (Bolder *et al*., 2006). تصاویر بدست آمده از TEM و AFM نشان دادندکه فیبریل‌های ایزوله پروتئین سویا (SPI)، ضخامتی بین 1 تا 10 نانومتر دارند و ساختارشان بسیار منشعب است (شکل 1). اگر چه توانایی تولید فیبریل، یک خصوصیت عمومی برای پروتئین محسوب می‌شود ولی ویژگی‌های ظاهری و عملکردی هر فیبریل مختص منبع پروتئینی تهیه شده از آن محسوب می‌گردد (Sagis *et al*., 2004). به‌عنوان مثال فیبریل‌های بتالاکتوگلوبین معمولا بلند، طول 10 میکرومتر ضخامت 4 نانومتر (Veerman *et al*., 2002)، فیبریل‌های حاصل از آلبومین سرم گاوی کوتاه تر و طول 100- 300 نانومتر (Veerman *et al*., 2003) و فیبریل‌های گلیسین سویا طول یک میکرومتر، ضخامت چند نانومتر و دارای شاخه‌های جانبی فراوان هستند (Akkermans *et al*., 2008).

اندازه ذرات

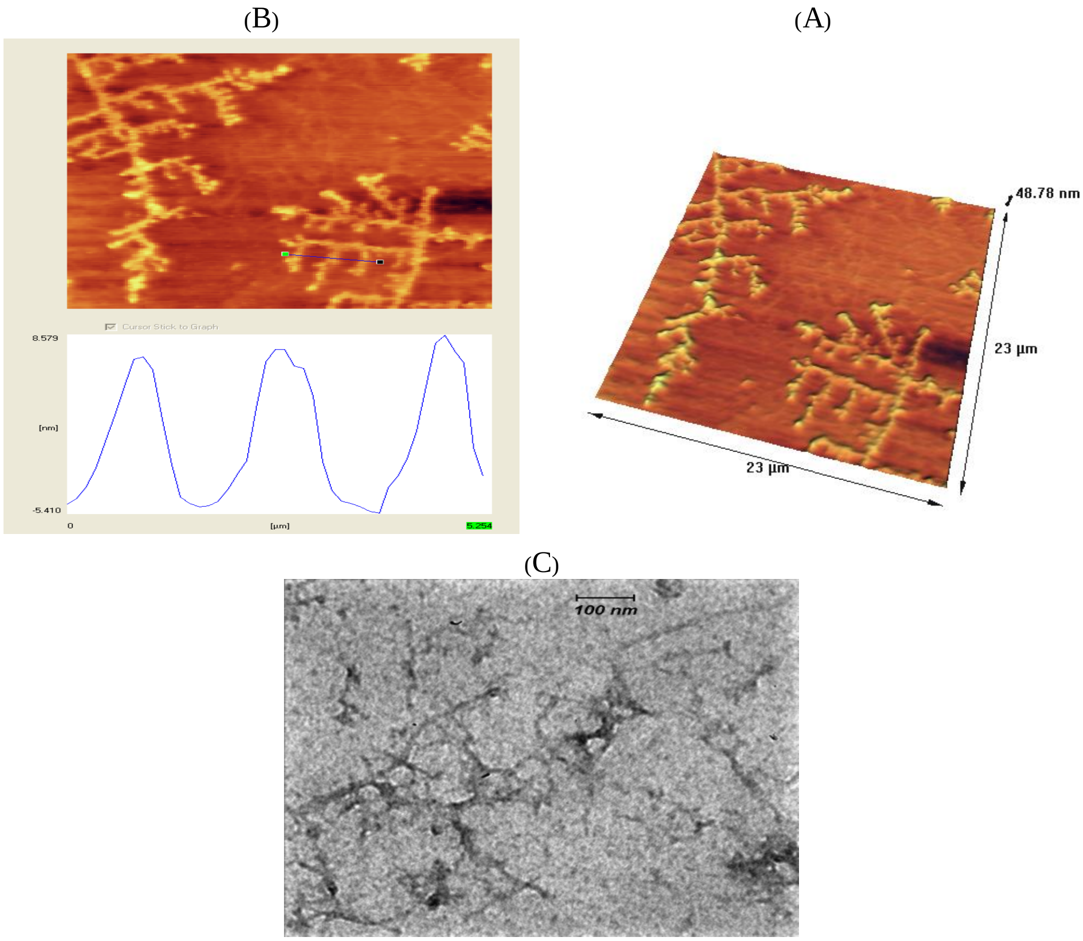
اندازه ذرات فاز پراکنده از مهمترین ویژگی‌های کیفی امولسیون‌ها می‌باشد. بررسی روند تغییرات اندازه قطرات با توجه به شکل 2 نشان داد که $D_{(3, 2)}$ این ذرات بین 5/64 و 7/01 میکرومتر بود و افزایش تعداد لایه‌ها در اندازه ذرات نمونه تغییر معنی‌دار و قابل ملاحظه‌ای نداشت ($p>0/05$). Humblet-Hua و همکاران (2011) و Sagis و همکاران (2008) به نتایج مشابهی دست یافتند و عنوان کردند که این سیستم توانایی تولید ریزکپسول‌هایی با تعداد لایه‌های مختلف با متوسط اندازه ذرات یکسان، که مشکلات مرسوم در مطالعات قبلی از جمله تشکیل لخته و رسوب را رفع کرده است. بررسی منحنی توزیع اندازه ذرات امولسیون‌ها نشان داد که تمام نمونه‌ها به‌صورت تک کوهانه بوده و توزیع نرمال داشتند (شکل 4). این مساله بیانگر دو نکته حائز اهمیت می‌باشد: اولا انرژی ورودی به سامانه (انرژی صوت) به اندازه کافی بالا بوده تا فاز پراکنده را به‌طور یکنواخت خرد کرده، به قطرات کوچک بشکند، ثانیا غلظت امولسیفایر و پایدارکننده نیز به حدی بود تا قطرات را بلافاصله بعد از تشکیل به‌طور کامل بپوشاند و از امتزاج و درهم آمیختن مجدد آنها جلوگیری نماید در غیر این صورت منحنی توزیع اندازه ذرات غیرنرمال و چند کوهانه می‌بود.

پتانسیل زتا

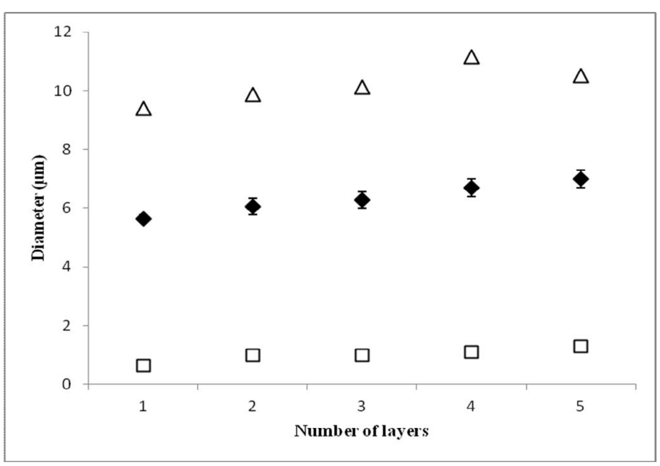
پتانسیل زتا یکی از فاکتورهای مهم در پایداری ذرات ریزپوشانی شده است. هر اندازه پتانسیل زتا بیشتر، بارسطحی ذرات بیشتر و در نتیجه دافعه الکترواستاتیک بالاتر و میزان چسبندگی ذرات کمتر خواهد بود (Fathi *et al*., 2013). همان طورکه در شکل (4) مشاهده می شود توزیع زتا پتانسیل ذرات از حدود 30 (+) (لایه بیرونی از جنس فیبریل‌های ایزوله پروتئین سویا با شماره فرد زیرا پروتئین در زیر نقطه ایزوالکتریک‌اش قرار دارد) تا تقریبا 20 (-) (لایه بیرونی از جنس پکتین با لایه زوج) می‌باشد. که این مورد، تاییدکننده جذب لایه به لایه دیواره‌ها با بار مخالف، براساس واکنش‌های الکترواستاتیک می‌باشد. در این روش با جذب لایه به لایه الکترواستاتیک ذرات کلوئیدی با بار معکوس، کپسول‌هایی تشکیل می‌شوند که بار لایه نهایی بیرونی تعیین‌کننده بار خالص سطحی می‌باشد (McClements *et al*., 2005; Decher *et al*., 2003).

---

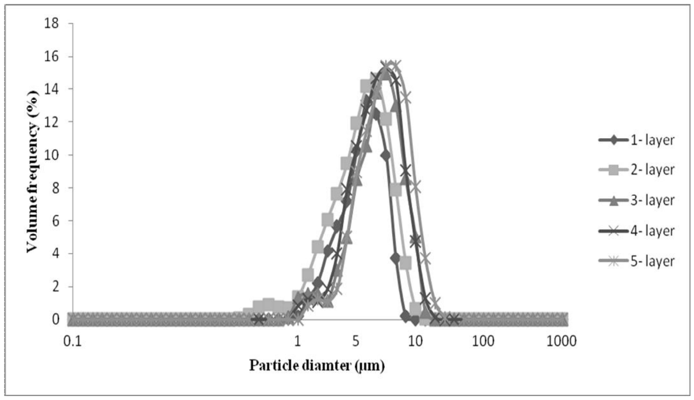
3 Rigter- peppas
4 ANOVA
5 Correlation coefficient



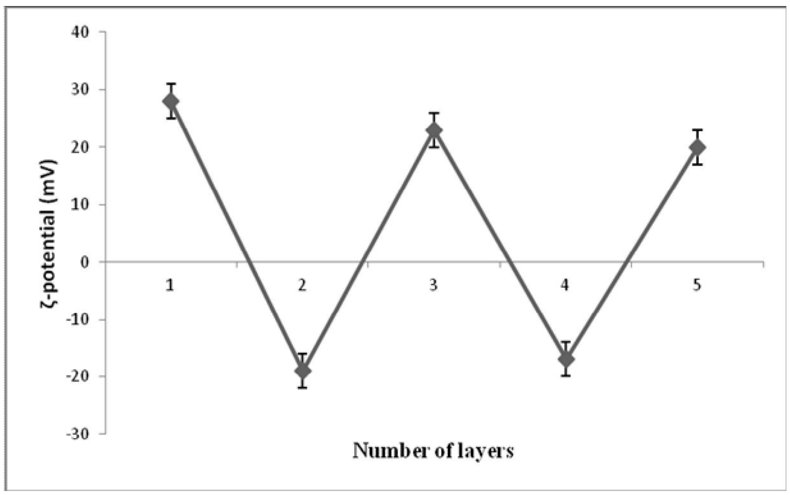
شکل 2- تصاویر سه‌بعدی و دو بعدی میکروسکوپ نیروی اتمی به ترتیب (A) و(B)، تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (C) فیبریل‌های ایزوله پروتئین سویا.



شکل3- اندازه ذرات ریزکپسول‌ها بعد از هر بار افزودن لایه به دیواره. (◆) D_{32} میانگین قطر اندازه ذرات. (□) d (1.0) و (△) d (0.9) قطر ذرات به ترتیب 10 و 90 درصد حجم تجمعی می‌باشند.



شکل 4- منحنی توزیع اندازه ذرات امولسیون‌های تازه تهیه شده با تعداد لایه‌های مختلف



شکل 5- پتانسیل زتا ریزکپسول‌ها بعد از هر بار افزودن لایه به دیواره.

میکروسکوپ الکترونی روبشی

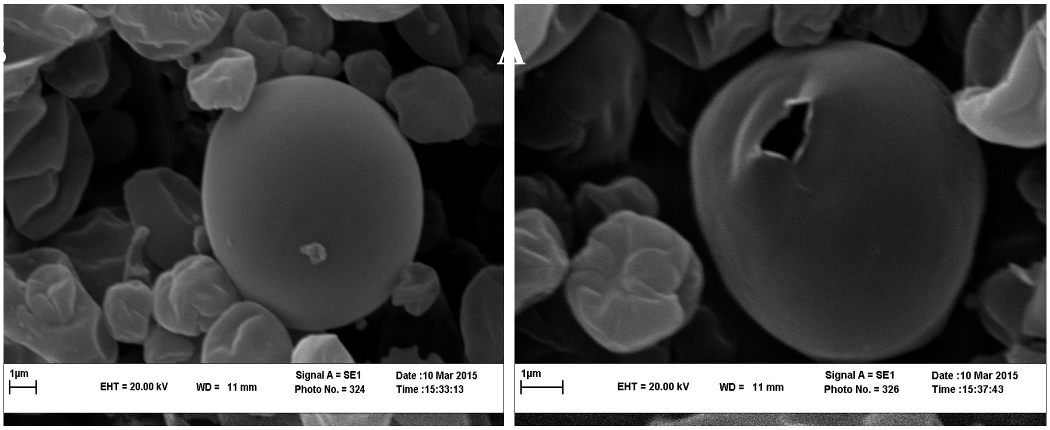
برای بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی نظیر اندازه و شکل ریزکپسول‌های تهیه شده با امولسیون‌های مختلف، از تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) استفاده شد. تصاویر SEM پودرهای ریزپوشانی شده با تعداد لایه‌های مختلف در شکل (5) آورده شده است. همانطورکه در شکل A (مربوط به ریزکپسول با دیواره تک لایه) مشاهده می‌شود دیواره دارای حفره و ترک خوردگی است که علت این امر را می‌توان به خروج سریع رطوبت در مراحل اولیه خشک کردن نسبت داد و دیواره به قدر کافی مستحکم نبوده تا تنش‌های ناشی از خروج سریع رطوبت را تحمل کند، در نتیجه ریزکپسول دچار فروپاشی و ترک خوردگی و ایجاد حفره می‌شود و یا مواد دیواره، به قدر کافی در سوسپانسیون موجود نبوده تا پوشش کاملی اطراف مواد هسته تشکیل گردد.

در حالی که ریزکپسول‌های شکل B (ریزکپسول با دیواره پنج لایه) سطحی صاف، بدون ترک خوردگی و فرورفتگی داشتند که این امر را می‌توان به استحکام دیواره ناشی از افزایش تعداد لایه‌ها نسبت داد. گزارش Humblet-Hua و همکاران (2011) هم گواه این واقعیت است که ریزکپسول‌هایی با تعداد لایه کمتر تمایل به چروکیده شدن و ترک‌خوردگی بعد از خشک شدن دارند؛ در صورتی که ریزکپسول‌هایی با تعداد لایه بیشتر شکل کروی و ساختار دیواره را بهتر حفظ کرده‌اند. اندازه ذرات ریزکپسول به‌دست آمده به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی عبوری با اندازه‌های به‌دست آمده از طریق پراکنش نور پویا تطابق داشت و تاییدکننده این واقعیت بودند که با افزایش تعداد لایه‌های دیواره قطر ذرات افزایش معنی‌داری نمی‌کند.

رهایش

قابل ذکر است راندمان ریزپوشانی ریزکپسول‌های چهار و پنج لایه (تقریبا 58 درصد) نسبت به ریزکپسول‌های اول تا سه لایه (راندمان بین 32 تا 45 درصد) دارای بازده بیشتری هستند. این امر احتمالا به دلیل ساختمان کروی تحلیل رفته با تورفتگی و

شکستگی‌های بیشتری است که در ریزکپسول‌های اول تا سه لایه مشاهده می‌شود و سبب هدر رفتن بیشتر ترکیبات فرار و معطر می‌شود و در نتیجه میزان راندمان ریزپوشانی کمتری دارند. با افزایش تعداد لایه‌های دیواره راندمان ریزپوشانی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت.



شکل 6- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (A) ریز کپسول تک لایه، (B) ریز کپسول پنج لایه

پروفایل رهایش دی‌استیل از ریزکپسول‌های یک تا پنج لایه به‌عنوان تابعی از زمان رهایش در شکل (5) نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود با افزایش تعداد لایه‌ها شیب پروفایل رهایش دی‌استیل کاهش یافت و حداکثر زمان رهایش دی‌استیل به‌عنوان تابعی از تعداد لایه‌ها به‌طور یکنواخت افزایش یافت که می‌توان این‌گونه استنباط کرد که با افزودن تعداد لایه‌های دیواره ریزکپسول، رهایش ماده ریزپوشانی شده را می‌توان به تاخیر انداخت. از آنجایی که دو مکانیسم عمده آزادسازی طی فرایند رهایش از ریز کپسول‌های چند لایه رخ می‌دهد، این نتایج با گزارشات منتشر شده توسط سایر محققین انطباق کامل دارد (Jafari *et al*., 2008). اولین مکانیسم خروج ماده ریزپوشانی شده از میان حفرات و سوراخ‌های پوسته ریزکپسول و دومین آن، رهایش ماده ریزپوشانی شده با استفاده از مکانیسم نفوذ از میان پوسته ریزکپسول می‌باشد و رهایش سریع اولیه (که تحت عنوان رهایش انفجاری[6] شناخته می‌شود) به ویژگی‌های سطح و پوسته ریزکپسول‌ها بستگی دارد. از این رو شیب اولیه موجود در پروفایل رهایش ریزکپسول‌های یک لایه نسبت به پنج لایه بیشتر است. این امر احتمالاً به دلیل افزایش ضخامت پوسته و کاهش شکستگی‌ها و حفرات ریزکپسول پنج لایه و همچنین پوشش‌دهی منسجم‌تر اطراف دی‌استیل بوده که باعث کاهش سرعت انتشار آن از ریزکپسول‌های پنج لایه نسبت به یک لایه می‌شود. این نتایج ثابت می‌کند که خصوصیات رهایش و نفوذپذیری دیواره را می‌توان با تعداد لایه‌های دیواره کنترل کرد (Humblet-Hua *et al*., 2011).

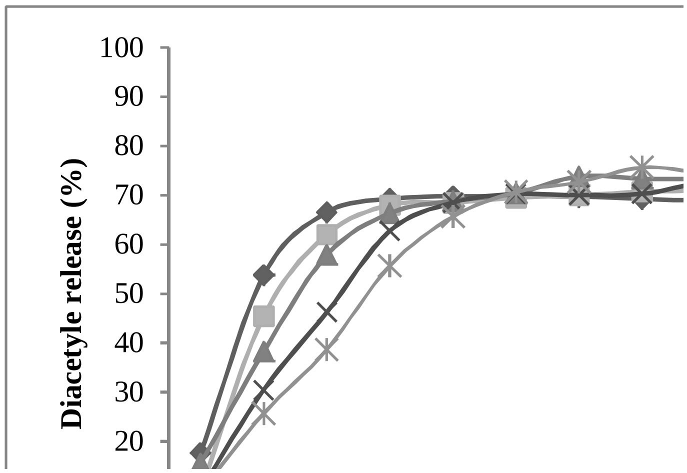
شکل 6، پروفایل رهایش دی استیل از ریزکپسول‌های یک تا پنج لایه را به‌عنوان تابعی از تنش برشی محیط رهایش نشان می‌دهند. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که اعمال تنش برشی سبب افزایش سرعت رهایش می‌گردد. به نظر می‌رسد که اعمال تنش برشی همانند یک نیروی فشاری عمل کرده، خروج دی استیل را از منافذ ریزکپسولها افزایش می‌دهد. علاوه بر این طی اعمال تنش برشی برخی از ریزکپسول‌ها تخریب شده، این امر سبب افزایش میزان انتشار ماده ریزپوشانی شده به محیط می‌شود. نتایج مشابهی برای بررسی تأثیر فرآیند جویدن بر میزان سرعت رهایش عطر و طعم توسط برخی از پژوهشگران گزارش شده است. Zandi و همکاران (2013) و Van Ruth and Roozen (2000) گزارش نمودند که اعمال و افزایش فرایند جویدن شبیه‌سازی شده سبب افزایش سرعت رهایش عطر و طعم از ماتریکس کپسوله‌کننده می‌گردد.

مدل‌سازی رهایش

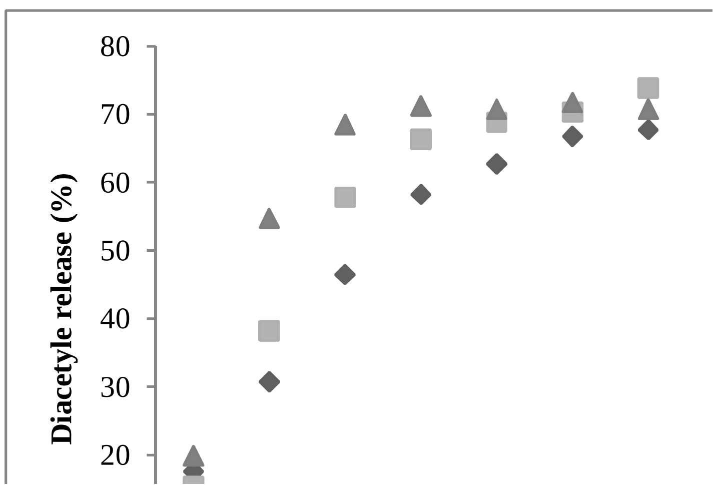
به‌منظور بررسی مکانیسم رهایش دی‌استیل از ریزکپسول‌ها، مدل‌های کینتیکی مختلف به داده‌های تجربی رهایش برازش گردید. پارامترهای حاصل از برازش مدل‌های مورد استفاده بر روی داده‌های رهایش در جداول 1، خلاصه گردیده است. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که مدل کینتیکی ریگر-پپاس از نظر ریاضی بهترین توصیف را برای رهایش دی‌استیل از ریزکپسول‌ها فراهم آورد، به‌گونه‌ای که ضریب همبستگی حاصل در تمامی برازش‌ها با این مدل بالای 0/94 بود.

---

6 Burst-release phenomenon



شکل 7- پروفایل رهایش دی استیل از ریزکپسول‌های یک تا پنج لایه به‌عنوان تابعی از زمان رهایش



شکل 8- تاثیرتنش برش بر پروفایل رهایش دی استیل از ریزکپسول 3 لایه

جدول 1- پارامترهای مدل حاصل از برازش مدل‌های مختلف بر نتایج تجربی برای ریزکپسول‌های چند

ریزکپسول با تعداد لایه	ریگتر-پپاس			هیگوچی		درجه یک		درجه صفر	
	R^2	n	K	R^2	K	R^2	K	R^2	K
1	0/98	0/086	59/51	0/86	29/37	0/72	0/278	0/69	10/90
2	0/99	0/159	52/61	0/91	29/30	0/77	0/264	0/75	10/97
3	0/99	0/232	47/02	0/82	29/64	0/84	0/265	0/50	11/19
4	0/99	0/317	39/23	0/93	28/54	0/77	0/233	0/63	10/87
5	0/98	0/419	32/78	0/91	28/49	0/91	0/225	0/49	10/98

بدترین مدل، مدل درجه صفر بود که ضریب تبیین پایین این مدل نشان‌دهنده این است که رهایش دی‌استیل وابسته به غلظت می‌باشد. میزان پارامتر n برای ریزکپسول‌ها کمتر از 0/45 بود و نشان‌دهنده این است که رهایش بر اساس مکانیسم نفوذ فیک[7] رخ

7 Fickian diffusional

داده، این نوع رهایش به‌عنوان مکانیسم غالب در آزادسازی دی‌استیل از ریزکپسول‌ها می‌باشد (Chakeraborti *et al*., 2011).

همانطور که قبلاً نیز اشاره شد برای یافتن ضریب نفوذ از مدل برآمده از قانون فیک استفاده شد (معادله 5). مقدار ضریب نفوذ را برای فرآیند رهایش دی‌استیل از ریزکپسول‌های چند لایه تحت شرایط نیروی برشی مختلف در جدول 2 نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود هرچه تعداد لایه‌های دیواره ریزکپسول‌ها افزایش می‌یابد، ضریب نفوذ کمتری دارند که در نتیجه باعث کاهش سرعت رهایش دی‌استیل می‌شود.

این امر احتمالاً به دلیل افزایش ضخامت پوسته ریزکپسول چند لایه و همچنین پوشش کامل اطراف پوسته‌ها می‌باشد که باعث کاهش سرعت انتشار دی‌استیل از ریزکپسول‌های چند لایه می‌شود.

با توجه به جدول2، همانگونه که انتظار می‌رفت با اعمال و افزایش تنش برشی در محیط رهایش، ضریب نفوذ افزایش پیدا کرد. این افزایش احتمالاً به سبب تاثیر تنش برشی به‌عنوان یک نیروی فشاری باشد. علاوه بر این طی اعمال تنش برشی برخی از ریزکپسول‌ها تخریب شده و در نتیجه سبب افزایش میزان انتشار دی‌استیل به محیط نیز می‌شود. نتایج مشابهی برای تاثیر فرایند جویدن بر میزان سرعت رهایش عطر و طعم توسط برخی از محققان گزارش شده است. Van Ruth و Roozen (2000) و نیز Brown و Wilson (1996) گزارش نمودند که اعمال و افزایش فرایند جویدن شبیه‌سازی شده سبب افزایش سرعت رهایش عطر و طعم از ماتریکس کپسوله‌کننده می‌گردد.

جدول 2- ضریب نفوذپذیری برای رهایش دی استیل از ریزکپسول چند لایه در نیروی برشی مختلف.

تعداد لایه های دیواره ریزکپسول	نیروی برشی (معکوس ثانیه)	یک لایه	دو لایه	سه لایه	چهار لایه	پنج لایه
ضریب نفوذپذیری	0	$0/206\times10^{-13}$	$0/156\times10^{-13}$	$0/098\times10^{-13}$	$0/047\times10^{-13}$	$0/012\times10^{-13}$
	50	$2/260\times10^{-13}$	$2/249\times10^{-13}$	$1/931\times10^{-13}$	$1/741\times10^{-13}$	$1/308\times10^{-13}$
	100	$6/451\times10^{-13}$	$5/861\times10^{-13}$	$5/352\times10^{-13}$	$4/854\times10^{-13}$	$4/123\times10^{-13}$

نتیجه‌گیری

این پژوهش به‌منظور ارائه روشی آسان و با قابلیت اجرایی در مقیاس صنعتی، برای تولید ریزکپسول‌های جدید انجام شد. ریزکپسول‌ها بوسیله تکنیک لایه به لایه از مواد خوراکی و ارزان قیمت فیبریل ایزوله پروتئین سویا و پکتین تولید شد. نتایج نشان داد این سیستم توانایی تولید ریزکپسول‌هایی با تعداد لایه‌های مختلف ولی متوسط اندازه ذرات یکسان را دارد، که مشکلات مرسوم در مطالعات قبلی از جمله تشکیل لخته و رسوب را رفع کرده است. با افزایش تعداد لایه‌ها شیب پروفایل رهایش دی‌استیل کاهش یافت. سرعت رهایش دی‌استیل از ریزکپسول‌های چندلایه کمتر از ریزکپسول‌ها یک لایه می‌باشد که این امر به دلیل پوشش کامل اطراف پوسته‌ها و افزایش ضخامت پوسته ریزکپسول چندلایه می‌باشد که باعث کاهش سرعت انتشار دی‌استیل از ریزکپسول‌های چندلایه می‌شود. به‌منظور بررسی مکانیسم رهایش دی‌استیل از ریزکپسول‌های چند لایه، مدل‌های کینتیکی مختلفی بر داده‌های تجربی رهایش برازش گردید، نتایج حاصل نشان داد که رهایش از این ریزکپسول‌ها بر اساس مکانیسم نفوذ رخ داده است که به‌عنوان مکانیسم غالب در این فرایند رهایش است. از آنجایی که مواد اولیه تهیه ریزکپسول قابلیت خوراکی داشتند، این ریزکپسول‌ها می‌تواند در محصولات غذایی یا اهداف دارویی کاربرد داشته باشد.

منابع

Ai, H., Jones, S. A., & Lvov, Y. M. (2003). Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 39: 23-43.

Akkermans, C., Van der Goot, A. J., Venema, P., Van der Linden, E., & Boom, R. M. (2008). Formation of fibrillar whey protein aggregates: influence of heat and shear treatment, and resulting rheology. *Food Hydrocolloids*, 22: 1315-1325.

Arsianti, Y., Hui, Zh., Sagis, L. (2011). Multilayer microcapsules based on supramolecular structures produced from bovine serum albumin and high methoxy pectin. *11th International Congress on Engineering and Food* - Athens, Greece, 29-30.

Brown, W. E., and Wilson, C. E. 1996. Individuality of flavour perceptions - the influence of mastication patterns. In Flavour science recent developments (pp. 451-455). Cambridge: *The Royal Society of Chemistry*.

Bucking, M., Haugen J.E., and Steinhart, H. 2003. Flavour Research at the Dawn of the Twenty-First Century. Proceedings of the 10th Weurman Flavour Research Symposium, (pp. 528–531). *Beaune*, France.

Bolder, S.G.; Hendrickx, H.; Sagis, L.M.C.; Van der Linden, E. (2006). Fibril assemblies in aqueous whey protein mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4229-4234.

Chakraborty, M., Dasgupta, S., Soundrapandian, C., Chakraborty, J., Ghosh, S., Mitra, M. K., & Basu, D. (2011). Methotrexate intercalated ZnAl-layered double hydroxide. *Journal of Solid State Chemistry*, 184, 2439–2445.

Dash, S., Murthy, P.N., Nath, L., Chowdhury, P., 2010. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm* 67, 217-223.

Decher, G., Hong, J. D., & Schmitt, J. (1992). Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*, 210-211(Part 2), 831-835.

Decher, G. (2003). Multilayer thin films: sequential assembly of nanocomposite materials. In G. Decher, & J. B. Schlenoff (Eds.) (pp. 1e46). *Weinheim*, Germany: Wiley-VCH.

Fathi, M., Mirlohi, Maryam., Varshosaz, Jaleh., & Madani Golnoosh. (2013). Novel Caffeic Acid Nanocarrier: Production, Characterization, and Release Modeling. *Journal of Nanomaterials* , 434632: 1-9.

Gunning, Y. M., Gunning, P. A., Kemsley, E. K., Parker, R., Ring S. G., Wilson, R. H., and Blake, A. 1999. Factors Affecting the Release of Flavor Encapsulated in Carbohydrate Matrixes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 5198-5205.

Humblet-Hua, K.N.P., Scheltens, G., van der Linden, E., Sagis, L.M.C. (2011). Encapsulation systems based on ovalbumin fibrils and high methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids*, 25: 569-576.

Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., Desobry, S. and 2006. Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology* , 41, 1–21.

Mauser, T., Déjugnat, C., & Sukhorukov, G. B. (2006). Balance of hydrophobic and electrostatic forces in the pH response of weak polyelectrolyte capsules. *The Journal of Physical Chemistry* B, 110(41): 20246-20253.

McClements, D.J. (2005). Theoretical analysis of factors affecting the formation and stability of multilayered colloidal dispersions. *Langmuir*, 21(21): 9777-9785.

Morris, E. R., Gidley, M. J., Murray, E. J., Powell, D. A., & Rees, D. A. (1980). Characterization of pectin gelation under conditions of low water activity, by circular dichroism, competitive inhibition and mechanical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2: 327-330.

Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., Durrieu, V. (2012). Influence of soy protein's structural modifications on their microencapsulation properties: α-Tocopherol microparticle preparation. *Food Research International*, 48:387–396.

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., and Bugarski, B. 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806–1815.

Nishinari, K., Fang.Y., Guo. S., Phillips, G.O. (2014). Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocolloids*, 39: 301-318.

Peyratout, C. S., & Dähne, L. (2004). Tailor-made polyelectrolyte microcapsules: from multilayers to smart containers. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(29): 3762-3783.

Roth, G. I. and Calmes, R. 1981. Oral Biology. St. Louis: The CV Crosby Co.

Rodrigues J. A., and Barros, A. A. 1997. Determination of diacetyl in beer using differential-pulse polarography. *Journal of the Institute of Brewing*, 103, 311-314.

Sagis, L.M.C., Veerman, C., & Van der Linden, E. (2004). Mesoscopic Properties of semiflexible Amyloid Fibrils. *Langmuir*, 20: 924-927.

Sagis, L.M.C., De Ruiter, R., Rossier-Miranda, F.J., De Ruiter, J., Schroen, K., Van Aelst, A.C., Kieft, H., Boom, R., Van der Linden, E. (2008). Polymer Microcapsules with a Fiber-Reinforced Nanocomposite Shell. *Langmuir*, 24:1608-1612.

Sriamornsak, P. (2003). Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: a review. *Silpakorn University International Journal*, 3: 206-228.

Van Ruth, S. M., and Roozen, J. P. 2000. Influence of mastication and saliva on aroma release in a model mouth system. *Food Chemistry*, 71, 339-345.

Veerman, C.; Ruis, H.; Sagis, L.M.C.; Van der Linden, E. (2002). Effect of electrostatic interactions on the percolation concentration of fibrillar β-lactoglobulin gels. *Biomacromolecules*, 3: 869-873.

Veerman, C.; Baptist, H.; Sagis, L.M.C.; Van der Linden, E. (2003). A new multistep Ca2+-induced cold gelation process for β-lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 3880-3885.

Wang, C., Ye, S., Sun, Q., He, C., Ye, W., Liu, X., et al. (2008). Microcapsules for controlled release fabricated via layer-by-layer self-assembly of polyelectrolytes. *Journal of Experimental Nanoscience*, 3(2): 133-145.

Yow, H. N., & Routh, A. F. (2006). Formation of liquid coreepolymer shell microcapsules. Soft Matter, 2: 940-949.

Zandi, M., Mohebbi, M., Varidi, M., and Ramezanian, N. 2013. Evaluation of diacetyl encapsulated alginate-whey protein microspheres release kinetics and mechanism at simulated mouth conditions. *Food Research International journal*.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 4, Oct- Nov 2017, p. 553-565

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 13، شماره 4، مهر - آبان 1396، ص. 565-553

Investigation of multilayer microcapsules based on electrostatic adsorption of soy protein isolated fibrils and high methoxyl pectin containing diacetyl

E. Ansarifar[1], F. Shahidi[2*], M. Mohebbi[2], A. Koocheki[3], N. Ramazanian[4]

Received: 2016.05.01
Accepted: 2016.08.06

Introduction: Microencapsulation has become an important technique in the food industry. One of the methods of producing microcapsules is to use layer-by-layer adsorption, in which oppositely charged polyelectrolytes are adsorbed consecutively onto a colloidal template. Creating multilayer films based on electrostatic interactions between oppositely charged components was introduced in 1991 by Decher et al. Layer-by-layer (LbL) polyelectrolyte deposition has become a popular technique for preparing polyelectrolyte capsules because of its ability to create highly tailored capsule shells through a simple, inexpensive and easily controllable adsorption process. It has been applied to produce capsules of various sizes, ranging from the nanometer to micrometer scale, with well-defined barrier properties. In this technique, assembly is driven by the electrostatic attraction of oppositely charged materials to form polyelectrolyte shells. The structure of the polyion layered capsule shell is determined mainly by the electrostatic interactions between the polyions used. The mechanical strength and permeability of the capsules can be controlled by varying the number of layers or by changing the characteristics of the encapsulating materials. The purpose of this study was to produce microcapsules using supramolecular assemblies consisting of common food ingredients such as soy protein isolate (SPI) and high methoxyl (HM) pectin. Moreover, some features of the developed microcapsulation were studied.

Materials and methods: SPI fibrils were prepared based on the method developed by Akkermans et al., (2008) and its morphology was studied using transmission electron microscopy (TEM) and atomic force microscopy (AFM). 0.5% (w/w) SPI fibril and pectin solutions were prepared by mixing at pH 3.5 were left stirring overnight. The LbL process for the production of microcapsules with protein fibril-reinforced nanocomposite shells has been described in Humblet-Hua et al., 2012. It starts with the production of A 2% w/w emulsion of (0.05 gr diacetyl in 1.95gr sun flower oil) in fibril SPI solution is produced using a homogenizer with a rotor-stator dispersion tool using a setting of 13500 rpm for 90 S. Because the proteins are below their isoelectic point, the emulsion droplets have a positive charge. To avoid interactions between the nonadsorbed SPI and the biopolymer of the next layer, the droplets are separated from the serum by means of centrifugation. After the isolation, the droplets are dispersed into a solution of HMP. The HMP is negatively charged at the chosen pH of 3.5. The bilayered droplets can be isolated again and dispersed in a fibril solution to deposit a third layer of a positively charged mixture of SPI fibrils. Subsequently, additional layers of HMP and SPI fibrils can be deposited by repeating the same procedures. Some features of the microcapsulation, including size, zeta potential, and morphology and release kinetics were studied.

Results & discussion: TEM and AFM micrographs showed that SPI fibrils obtained had a contour length of a few hundred nanometers, thickness of between 1 and 10 nm and its structure is highly branched. One of the most common problems reported in previous studies using the LbL technique to produce multilayer particles, is the tendency for flocculation. In the present system, this problem was not observed. The size distribution of isolated emulsion droplets (templates) did not change significantly from 1-layer droplets to 5-layer droplets. In other words, the emulsion droplets were stable against flocculation after applying more layers of polyelectrolytes. The Sauter mean diameters D (3, 2) of these droplets fluctuated between 5 and 7 µm and slightly increased as the number of layers increased; noting that the emulsion droplets were poly-dispersed. Another possible problem that may occur using the LbL technique is the complex formation between non-adsorbed protein and the pectin molecules. These complexes with a typical diameter smaller than 1 mm were not detected here. Result showed that the zeta potential distribution of emulsion droplets reverses from about plus (+) 30 mV (odd number of layers with SPI fibrils as outer layers) to about negative (-) 20 mV (even number of

1, 2 and 3. Former PhD. Student, Professor and Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Polymer Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
(Corresponding author email address: fshahidi@um.ac.ir)

layers with HMP as outer layers) confirming the layer-by-layer adsorption based on electrostatic attraction. Comparing SEM of microcapsules with various numbers of layers, an improvement in shell strength can be seen. Indentation is observed on 1-layer microcapsules showing that there are defects on the shell. They could be formed during the drying process or they are shell defects due to incomplete coverage of materials, meaning more layers are needed to fully cover the microcapsule shell. These defects are seen less on 5-layer microcapsules. These observations indicate that the more layers the more consistent the shells and the more resistant. It is against the physical drying process. Results showed that the time of the maximum in release shifts to higher values as the number of layers of the capsules increased. We clearly see that increasing the number of layers in the shell of the capsules leads to a delay of the release of diacetyl and maximum release time as a function of the number of layers is increasing steadily which show the release can be delayed even more by adding additional layers. These results prove that the release properties of the multilayer capsules can be tuned by controlling the number of layers in the shell of the capsules. The modeling results of four different kinetic models are indicated that the Rigter–Peppas was an appropriate model for diacetyl release prediction from multilayer microcapsulation. It could be attributed that the release mechanism is mostly governed by the Swelling–Fickian mechanism.

Conclusion: In this study, the microcapsules were produced using the LbL technique and food-grade SPI fibrils and HMP. The microcapsules had a poly-disperse size distribution. No flocculation of microcapsules during applying of additional layers was observed. It was found that increasing the number of layers, decreases the release rate of diacetyl. The diacetyl release data were kinetically evaluated by zero-order, first-order, Higuchi, and Rigter–Peppas models and the results showed that the release phenomena is mostly governed by the Fickian mechanism. Since the materials are food-grade, the applications of these microcapsules can include food products or pharmaceutical purposes.

Keywords: Multilayer microcapsules, Controlled release, Soy protein isolated fibril, Pectin, Diacetyl